

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Offic européen des brevets



(11)

EP 0 770 324 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
02.05.1997 Patentblatt 1997/18

(51) Int Cl.⁶: **A01H 3/04**(21) Anmeldenummer: **96890147.0**(22) Anmeldetag: **23.09.1996**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV SI

(72) Erfinder: **Fuchs, Norbert, Mag.**
5571 Mariapfarr (AT)

(74) Vertreter: **Pawloy, Heinrich, Dr. et al**
Patentanwälte
Sonn, Pawloy, Weinzinger & Wolfram
Riemergasse 14
1010 Wien (AT)

(30) Priorität: **09.10.1995 AT 1668/95**

(71) Anmelder: **Fuchs, Norbert, Mag.**
5571 Mariapfarr (AT)

(54) Pflanzenkeimlinge sowie Verfahren zu deren Herstellung

(57) Die Erfindung betrifft Keimlinge mit einem gegenüber der Keimung in Leitungswasser erhöhtem Gehalt an Elektrolyten sowie ein Verfahren zur Herstellung dieser Keimlinge, bei welchem keimfähige Samen in einer Elektrolytlösung zur Keimung gebracht werden.

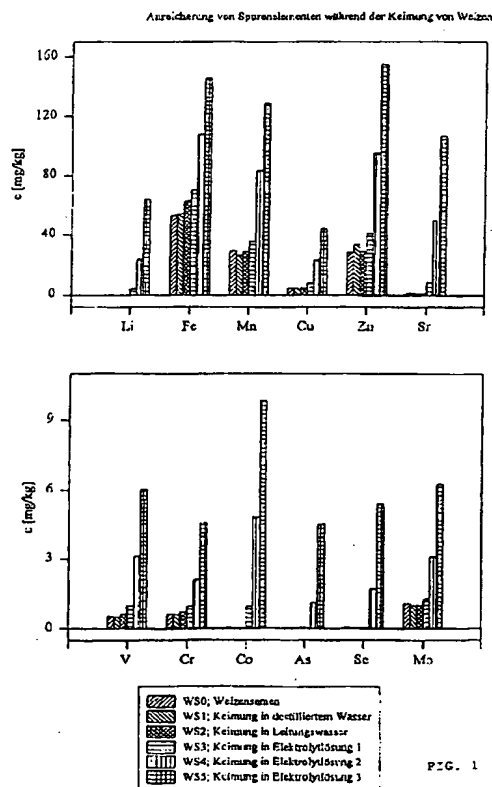


FIG. 1

EP 0 770 324 A2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Pflanzenkeimlinge sowie Verfahren zu deren Herstellung.

Das gegenwärtige Nahrungsangebot sowie das Konsumverhalten ist gekennzeichnet durch Lebensmittel mit hohem Kaloriengehalt und gleichzeitig geringen Anteilen an Ballaststoffen und geringer Nährstoffdichte (geringen Gehalten an Vitaminen, Mengenelementen, Spurenelementen, bioaktiven Pflanzenstoffen, etc.). So wird mit den bevorzugt konsumierten Lebensmitteln, wie Weißmehlprodukten (Brot, Gebäck, Eierteigwaren, Feingebäck), Zucker und zuckerhaltigen Lebensmitteln (Süßigkeiten, zuckerhaltigen Limonaden), Fastfood-Gerichten und Lebensmitteln mit hohem Anteil an tierischen Proteinen der Bedarf an Ballaststoffen, vor allem aber an Vitaminen, Mengen- und Spurenelementen, nur unzureichend gedeckt. Die Folge dieses Konsumverhaltens ist ein ständig steigender Anteil ernährungsbedingter und ernährungsabhängiger Erkrankungen, wie Übergewicht, chronische Stuhlbeschwerden, Bluthochdruck mit erhöhten Blutfett- und Triglyceridwerten, Zuckerstoffwechselstörungen, Leber- und Gallenerkrankungen, Durchblutungsstörungen, Erkrankungen der Verdauungsorgane, Karies, rheumatische Erkrankungen, Gicht, Hauterkrankungen, Allergien und Störungen der Immunabwehr.

Parallel zur Entvitaminisierung und Entmineralisierung häufig konsumierter Grundnahrungsmittel (z.B. durch Raffination verschiedener Getreidemehle und Pflanzenöle) ist statistisch eine stetig zunehmende Kontamination von Grundnahrungsmitteln mit Fremd- und Schadstoffen zu verzeichnen (Organohalogenverbindungen, Agrochemikalien, wie Pestizide, Wachstumsregulatoren, Keimhemmern und Düngemitteln, Schwermetalle, Arzneimittelmrückstände, Pflanzengifte, etc.).

Nicht zuletzt werden Lebensmittelgrundstoffe aus produktionstechnischen Gründen mit Farbstoffen, Konservierungsstoffen, Antioxidationsmitteln, Emulgatoren, Stabilisatoren, Dickungsmitteln, Geliermitteln, modifizierten Stärken, Säuerungsmitteln, Säureregulatoren, Trennmitteln, Überzugsmitteln, Tauchmassen, Geschmacksverstärkern, Aromastoffen, Zuckeraustauschstoffen, künstlichen Süßstoffen und sonstigen technologischen Stoffen versetzt.

Um dieser Verschlechterung der Ernährungssituation bzw. diesen negativen Entwicklungen des Ernährungsverhaltens entgegenzuwirken, sind immer mehr Konsumenten daran interessiert, diese Ernährungsgewohnheiten zu verändern und vermehrt naturbelassene Lebensmittel zu konsumieren, die eine ausreichende Versorgung mit Ballaststoffen, Mineral- und Spurenelementen, Vitaminen, pflanzlichen Proteinen, etc. ermöglichen (sogenannte "Vollwerternährung").

Die Vollwerternährung besteht vorwiegend aus pflanzlichen Lebensmitteln aus ökologischer Produktion, wobei isolierte oder raffinierte Produkte möglichst vermieden werden.

Keimlinge erfüllen die Prinzipien der Vollwerternährung, sowohl nach ernährungsphysiologischen als auch nach ökologischen Gesichtspunkten. Im Vergleich zum ungekeimten Samen hat der Keimling eine bessere Proteinqualität, einen höheren Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, eine verbesserte Bioverfügbarkeit essentieller Mineralstoffe und einen höheren Vitamin- und Ballaststoffgehalt. Weiters nimmt eine Vielzahl negativ zu bewertender Inhaltsstoffe im Samen, wie Trypsininhibitoren, Hämagglutinine, Saponine, Blähschubstanzen, etc. mit zunehmender Keimdauer ab.

Keimlinge stellen daher eine wertvolle Bereicherung der Nahrung dar, insbesondere, da sie beispielsweise im Vergleich zu Gemüsesorten preiswert, stets frisch, saisonunabhängig, ballaststoffreich, vitamin- und mineralstoffreich und zudem schmackhaft und gut bekömmlich sind.

Im allgemeinen bezeichnet man die aus einem Samenkorn wachsende Pflanze innerhalb der ersten Keimtage als Keimling. Der vorgebildete Keimling im Samen befindet sich vor der Keimung in einem Ruhezustand, in dem alle Stoffwechselvorgänge auf ein Minimum reduziert sind und kein Wachstum erfolgt. Der Quellprozeß beginnt mit der Aufnahme von Wasser in den Samen und bewirkt dadurch die Aktivität der Stoffwechselvorgänge. Die bis dahin sauerstoffundurchlässige Samenschale wird atmungsaktiv, Phytohormone (insbesondere Gibberellinsäure) werden im Embryo synthetisiert, die wiederum die Synthese spezifischer wirksamer Enzyme stimulieren. Diese Enzyme bauen die im Samen in artspezifischen Mengen gespeicherten Reservestoffe ab (Meier-Ploeger "Die Bedeutung von Sprossen und Keimen in der Vollwerternährung", Ernährung/Nutrition (6) (1990), 317-323).

Über die Veränderungen des Gehaltes an Inhaltsstoffen des Keimlings im Vergleich zum Samen sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden, wobei diese Untersuchungen häufig widersprüchlich sind. Inwieweit diese Diskrepanzen auf Unterschiede in der Beschaffenheit des Ausgangsmaterials, der Keimbedingungen oder der Methodik der Nährwertbestimmung beruhen, ist unklar (Harmuth-Hoene et al., "Der Einfluß der Keimung auf den Nährwert von Weizen, Mungobohnen und Kichererbsen", Z. Lebensm. Unters. Forsch., 185 (1987), 386-393).

Auch die Angaben über die Veränderungen des Mineralstoffgehaltes in Keimlingen sind widersprüchlich. Einigkeit scheint darüber zu herrschen, daß in Abhängigkeit der Löslichkeit der Mineralstoffe sehr verschiedene Verluste an Mineralstoffen während der Keimung auftreten können. Es wurde daher von verschiedenen Autoren eine Abnahme von Eisen in der Höhe von 9 bis 21 %, von Kalium von 27 % und von Kupfer zwischen 12 und 17 % beobachtet (Harmuth-Hoene (1987)).

Weiters wurden auch hohe Verluste an Kalzium und Magnesium im Verlaufe der Keimung berichtet.

Die vorliegende Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, Keimlinge zur Verfügung zu stellen, welche ernährungsphysiologisch gegenüber herkömmlichen Keimlingen verbessert sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch Keimlinge mit einem gegenüber der Keimung in Leitungswasser erhöhten Elektrolytgehalt gelöst.

Die erfindungsgemäßen Keimlinge weisen einen im Vergleich zu herkömmlich aufgekeimten Samen um mindestens 10 bis 20 %, vorzugsweise um mindestens das 1,5- bis 3-fache, insbesondere um mindestens das 5- bis 10-fache, erhöhten Gehalt an einem oder mehreren Elektrolyten, vorzugsweise an Zink, Eisen, Kalium, Magnesium, Kupfer, Mangan, Strontium, Selen, Molybdän, Chrom, Arsen, Vanadium und/oder Kobaltionen, auf.

Bislang traten bei der herkömmlichen Samenkeimung, bei welcher die Samen in destilliertem Wasser oder in Leitungswasser zur Keimung gebracht worden sind, immer zum Teil erhebliche Verluste an diesen für die Ernährung wichtigen Bestandteilen auf. Diese Verluste waren, wie sich bei den Untersuchungen zu der vorliegenden Erfindung herausstellte, sowohl durch den beginnenden Stoffwechselprozeß des Pflanzenkeimlings selbst bedingt, aber auch durch die Natur des Quellmittels Wasser, welches zu einer zusätzlichen Elektrolytauslaugung des Keimlings beitrug, da, im Gegensatz zum Ruhezustand (Samen), die Schale des Keimlings einer Elektrolytauslaugung sehr wohl zugänglich ist.

Es hat sich weiters gezeigt, daß die erfindungsgemäßen elektrolytangereicherten Keimlinge nicht nur eine höhere Konzentration an Mineralstoffen aufweisen, sondern, bedingt durch den erhöhten Mineralstoffgehalt, auch ganz allgemein im Hinblick auf ihre Inhaltsstoffe verbessert sind, beispielsweise einen erhöhten Vitamingehalt aufweisen.

Eine bevorzugte Herstellungsverfahren der erfindungsgemäßen Keimlinge besteht darin, daß die keimfähigen Samen in eine Elektrolytlösung eingebracht werden und die Keimlinge in der Elektrolytlösung bei einer geeigneten Temperatur während einer Zeitdauer, die ausreicht, um in den Keimlingen eine Elektrolytanreicherung zu erzielen, inkubiert werden.

Es war überraschend, daß unter Verwendung einer Elektrolytlösung, also einer Lösung, die im Gegensatz zu den herkömmlichen Keimungslösungen (Leitungswasser bzw. destilliertes oder sterilisiertes Wasser) erhöhte Ionenkonzentration beinhaltet, die im Zuge der Keimung auftretenden Elektrolytverluste ausgeglichen werden konnten bzw. sogar durch einen Elektrolytfluß aus der Keimungslösung in die Keimlinge ins Gegenteil verkehrt werden konnte und somit Keimlinge entstanden, die z.T. sogar einen gegenüber dem Samen erhöhten Gehalt an Elektrolyten aufweisen.

Unter Elektrolytlösung wird im weiteren eine wässrige Lösung verstanden, welche mit einem oder mehreren Elektrolyten wie nachstehend definiert versetzt bzw. angereichert ist.

Die Ionenkonzentration der Elektrolytlösung soll beim erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren um mindestens 10 bis 20 % über derjenigen von herkömmlichem Leitungswasser liegen, vorzugsweise ist die Ionenkonzentration der Elektrolytlösung zumindest in Bezug auf Eisen- und/oder Kupfer- und/oder Mangan- und/oder Strontium- und/oder Lithium- und/oder Molybdän-Ionen zweimal so hoch wie die von herkömmlichem Leitungswasser, besonders bevorzugt mindestens fünfmal so hoch, insbesondere mindestens zehnmal so hoch.

Die geeignete Temperatur zur Durchführung der Keimung ist selbstverständlich von Samenart zu Samenart verschieden. Prinzipiell ist die Keimungstemperatur, welche im Stand der Technik für die jeweilige Samenart beschrieben ist, auch für das erfindungsgemäße Verfahren anzuwenden. Vorzugsweise liegt diese Temperatur zwischen 10 und 50°C, insbesondere zwischen 20 und 30°C.

Die Zeitdauer, um in den Keimlingen eine ausreichende Elektrolytanreicherung zu erzielen, ist ebenfalls von Keimlingsart zu Keimlingsart unterschiedlich, es hängt auch davon ab, welche Elektrolytwerte im Keimling erreicht werden sollen. Auch hier dienen für eine bestimmte Art die Keimungsdauern, welche im Stand der Technik beschrieben sind, als Richtwerte, bevorzugterweise wird daher die Keimung während einer Zeitdauer von etwa 12 bis 120 Stunden, insbesondere etwa 60 bis 100 Stunden, durchgeführt.

Es versteht sich, daß sowohl die Keimungstemperatur als auch die Keimungsdauer von einem Fachmann ohne weiteres durch einfache Versuche für jedes System optimiert werden und für bestimmte Arten durchaus auch über oder unter den oben angegebenen Richtwerten liegen kann.

Als bevorzugte Keimlinge sind erfindungsgemäß Keimlinge von gängigen pflanzlichen Nahrungsmitteln vorgesehen, insbesondere Keimlinge von Hülsenfrüchten und Getreidesamen. Besonders bevorzugte Keimlinge sind daher Weizen-, Buchweizen-, Quinoa-, Mungobohnen-, Bockshornklee-, Rettich-, Alfalfa-, Mais-, Kürbis-, Roggen-, Gerste-, Reis-, Adzuki-Bohnen-, Erbsen-, Hirse-, Kichererbsen-, Kresse-, Leinsamen-, Linsen-, Senf-, Sesam-, Sojabohnen-, Sonnenblumen- und Amaranthkeimlinge.

Die beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Elektrolytlösung enthält gemäß einer bevorzugten Ausführungsform 1 mg/l oder mehr, vorzugsweise 10 mg/l oder mehr, insbesondere 50 mg/l oder mehr Zink- und/oder Eisen- und/oder Kalium- und/oder Magnesiumionen, 0,5 mg/l oder mehr, vorzugsweise 5 mg/l oder mehr, insbesondere 25 mg/l oder mehr Kupfer- und/oder Mangan- und/oder Strontium- und/oder Lithiumionen, 0,1 mg/l oder mehr, vorzugsweise 1 mg/l oder mehr, insbesondere 5 mg/l oder mehr Selen- und/oder Molybdän- und/oder Chrom- und/oder Arsen- und/oder Vanadium- und/oder Kobaltionen mit der Maßgabe, daß sich die Ionenkonzentration der Elektrolytlösung in zumindest einer Ionenspezies von der Ionenkonzentration in Leitungswasser um mindestens 10 bis 20 % unterscheidet.

Eine besonders bevorzugte Elektrolytlösung enthält zumindest 0,5 mg/l Kupfer- und/oder 1 mg/l Zink- und/oder 0,1 mg/l Kobalt- und vorzugsweise mindestens 0,1 mg/l Molybdän- und/oder 0,5 mg/l Lithium- und/oder 1 mg/l Selen- und/oder 1 mg/l Vanadiumionen.

Die erfindungsgemäßen Elektrolyt-angereicherten Keimlinge können nach ihrer Herstellung je nach Verwendungszweck gewaschen, getrocknet und gegebenenfalls für den Verkauf geeignet weiterverarbeitet werden. Besonders bevorzugt ist die Aufbereitung der erfindungsgemäßen Keimlinge zu Frischkost, zu Brotaufstrichen, zu Backwaren oder zu Snack-artigen Lebensmitteln oder Nahrungsergänzungen in Form von Mueslis, Kautabletten, Kapseln oder Liquida.

Die Erfindung wird in den nachstehenden Beispielen und den dazugehörigen Zeichnungen, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, noch weiter erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1 die Anreicherung von Spurenelementen während der Keimung von Weizen;

Fig. 2 die Anreicherung von Spurenelementen während der Keimung von Buchweizen,

Fig. 3 die Anreicherung von Spurenelementen während der Keimung von Quinoa; und

Fig. 4 die chromatographische Vitamin B1-Bestimmung in einer Standardlösung mit 104 µg/g Thiaminhydrochlorid und in der Probe BoS6 (Bockshornkleekeimlinge nach 3 Tagen Keimzeit).

Beispiele:

1. Anreicherung von Spurenelementen während der Keimung von Weizen, Buchweizen und Quinoa.

1.1. Keimung

Für die Keimversuche wurden keimfähige Samen von Weizen (*Triticum aestivum*), Buchweizen (*Fagopyrum esculentum*) und Quinoa (*Chenopodium quinoa*) verwendet. Ca. 90 g der drei verschiedenen Getreidesamen wurden jeweils mit fünf unterschiedlichen Lösungen zur Keimung gebracht: (1) zweifach destilliertes Wasser, (2) Leitungswasser, (3) Elektrolytlösung 1, (4) Elektrolytlösung 2 und (5) Elektrolytlösung 3 (siehe Tabelle 1). Zur Herstellung der Elektrolytlösungen wurden nur p.a. Chemikalien und zweifach destilliertes Wasser verwendet.

Tabelle 1:

Spurenelementkonzentrationen der verwendeten Elektrolytlösungen							
Substanz	Elektrolytlösungen c [mg/l]			Element	Elektrolytlösungen c [mg/l]		
	1	2	3		1	2	3
Zinksulfat x7H ₂ O	4,40	44,0	220	Zn	1,0	10	50
Ammonium-Eisen-III-citrat	8,95	89,5	447	Fe	1,0	10	50
Manganchlorid	1,48	14,8	74	Mn	0,5	5	25
Kupfergluconat	3,57	35,7	178	Cu	0,5	5	25
Natriumselenat	0,24	2,4	12	Se	0,1	1	5
Natriummolybdat	0,25	2,5	12,5	Mo	0,1	1	5
Chrom-III-chlorid	0,51	5,1	25,5	Cr	0,1	1	5
Strontiumlactat	1,69	16,9	84,5	Sr	0,5	5	25
Lithiumcarbonat	2,68	26,8	134	Li	0,5	5	25
Dinatriumarsenat	0,56	5,6	28	As	0,1	1	5
Ammonvanadat	0,23	2,3	11,5	V	0,1	1	5
Kobaltchlorid x6H ₂ O	0,40	4,0	20	Co	0,1	1	5

Vor der eigentlichen Keimphase wurde der Weizensamen 12 Stunden und der Quinoasamen 8 Stunden in den entsprechenden Lösungen eingeweicht. Der Buchweizensamen wurde ohne vorheriges Einweichen verwendet.

Die Keimung erfolgte bei Raumtemperatur (19 bis 21°C) und normalen Tag-Nacht-Lichtverhältnissen in handelsüblichen Keimgeräten, bestehend aus durchsichtigen, übereinander angeordneten Plastikschaalen mit Ablaufvorrichtung. Die Gesamtkeimdauer (Einweichzeit + Keimzeit) betrug für Weizen und Quinoa 96 Stunden, für Buchweizen 72 Stunden. Während der Keimung wurden die Keimlinge zweimal täglich mit den entsprechenden Lösungen (250 ml/90 g) gespült. Nach der Ernte wurden alle Keimlinge gründlich mit zweifach destilliertem Wasser gespült (3 x mit ca. 800 ml) und aliquotiert. Ein Teil der Probe wurde sofort in Plastiksäckchen abgefüllt und bei -18°C tiefgefroren. Der andere Teil der Probe wurde vor dem Einfrieren noch einmal mit 70°C heißem Leitungswasser nachgespült (3 x mit ca. 800

ml) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2:

Probenverzeichnis			
	Weizen	Buchweizen	Quinoa
Samen	WS0	BS0	QS0
Keimung mit destilliertem Wasser	WS1	BS1	QS1
Keimlinge heiß gewaschen	WS1H	BS1H	QS1H
Keimung mit Leitungswasser	WS2	BS2	QS2
Keimlinge heiß gewaschen	WS2H	BS2H	QS2H
Keimung mit Elektrolytlösung 1	WS3	BS3	QS3
Keimlinge heiß gewaschen	WS3H	BS3H	QS3H
Keimung mit Elektrolytlösung 2	WS4	BS4	QS4
Keimlinge heiß gewaschen	WS4H	BS4H	QS4H
Keimung mit Elektrolytlösung 3	WS5	BS5	QS5
Keimlinge heiß gewaschen	WS5H	BS5H	QS5H

1.2. Probenvorbereitung

Die Proben wurden in einer Gefriertrocknungsanlage (CHRIST ALFA 1-4 mit Anlagesteuerung LDC-1M) wie folgt getrocknet: Die Keimlinge (jeweils ca. 50 g) wurden zuerst bei -30°C (Tiefkühltruhe) und anschließend bei -45°C (Kondensatorraum der Gefriertrocknungsanlage) tiefgefroren. Danach erfolgte die Haupttrocknung bei -15°C und einem Druck von 0,31 mbar (Sicherheitsdruck 5 mbar). Nach 36 h wurde die Trocknungstemperatur (Temperatur des Probentellers der Anlage) auf 0°C erhöht. Nach einer Gesamtzeit von 72 h waren die Proben völlig trocken und für die weitere Probenvorbereitung verwendbar. Während des gesamten Trocknungsprozesses wurde sichergestellt, daß die Proben nie aufgetaut worden sind. Die getrockneten Keimlinge wurden anschließend in einer kontaminationsfreien Analysenmühle (Retsch ZM 1000, mit Titanrotor und Titansieb; Korngröße 0,25 mm) homogenisiert.

1.3. Bestimmung der Spurenelementkonzentrationen mit ICP-MS und GFAAS

Mineralisierung

Ungefähr 200 mg Probe wurden in ein Teflongefäß exakt eingewogen, mit 3 ml HNO₃ bidest. und 0,5 ml H₂O₂ versetzt und im Mikrowellenaufschlußgerät (MLS, 1200 mega, ausgestattet mit einem Rotor für 10 Proben) mit folgendem Energieprogramm mineralisiert: 2 min 250W, 0,5 min 0W, 10 min 250W, 0,5 min 0W, 5 min 450W, 0,5 min 0W, 7 min 600W, 1 min 500W. Nach dem Abkühlen wurden die Aufschlußlösungen in Maßkolben (10 ml) übergeführt und mit H₂O nanopur aufgefüllt. Von jeder Probe wurden zwei Aufschlüsse gemacht. Jede Aufschlußlösung wurde dreimal vermessen, wobei die gemessenen Konzentrationen mit den Konzentrationen eines Aufschluß-Blanks korrigiert wurden. Parallel zu den Proben wurden zur Überprüfung der Richtigkeit der Analyse zwei Standardreferenzmaterialien mit ähnlicher Matrixzusammensetzung (SRM-NIST 1575 Pine Needles und SRM-BCR 62 Olive Leaves) analysiert.

Messung mit GFAAS

Die Selen- und Arsenkonzentrationen wurden mit einem Hitachi Z9000 GFAAS bestimmt. Die experimentellen Bedingungen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Quantifiziert wurde mittels externer Eichkurven.

Tabelle 3:

Experimentelle Parameter zur Bestimmung der Se- und As-Konzentrationen mit GFAAS				
	Se	As	Se/As	
Lampenstrom	12 mA	12 mA	Standard 1	0 µg/l
Wellenlänge	195 nm	196	Standard 2	20 µg/l
Spalt	1,2 nm	1,3 nm	Standard 3	50 µg/l

EP 0 770 324 A2

Tabelle 3: (fortgesetzt)

Experimentelle Parameter zur Bestimmung der Se- und As-Konzentrationen mit GFAAS						
	Se		As		Se/As	
Kuvette	Tube		Tube		Standard4	
Modifizierer	2% Ni(NO ₃) ₂		2% Ni(NO ₃) ₂		Standard 5	
Volumen	20 µl		20 µl			
Temperatur-Programm						
	Se			As		
Trocken	80°C	120°C	30 s	80°C	120°C	30s
Trocken	120°C	400°C	10 s	120°C	500°C	20 s
Asche	700°C	700°C	30 s	800°C	800°C	30 s
Atom	2400°C	2400°C	10 s	2000°C	2000°C	10 s
Rein	3000°C	3000°C	5 s	3000°C	3000°C	5 s
Trärgas		200 ml/min			200 ml/min	
unterbr. Gas		30 ml/min			30 ml/min	

Messung mit ICP-MS

Die Konzentrationen der Spurenelemente Cr, Cu, Ni, Pb, Sr, Li, Fe, Zn, Mn, Cd, Co, Mo und V wurden mit einem ICP-MS der Firma Fisons, Typ PlasmaQuad II+ durchgeführt. Die experimentellen Parameter sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Vor der Messung wurden die Aufschlußlösungen 1 : 5 mit H₂O verdünnt. Um interne Geräteschwankungen zu korrigieren, wurde den Aufschlußlösungen und den Standardlösungen 50 ppb Indium, 50 ppb Gallium und 50 ppb Rhenium als interner Standard zugesetzt. Quantifiziert wurde mittels externer Eichkurven.

Tabelle 4:

Experimentelle Parameter zur Bestimmung der Spurenelementkonzentrationen mit ICP-MS			
	ICP-MS PlasmaQuad II+		
rf Leistung	1,3 kW	Zeit/Sweep	1,22 s
Colling-Gas	13,5 l/min	Verweilzeit	pulse count mode 320µs
Hilfsgas	1,1 l/min	Datenaufnahme	peak jump mode
Nebulizer-Gas	0,88 l/min	Aufnahmezeit	60 s
Nebulizer	Meinhard Tr-30-A3	Meßzeit	3 x 60 s
Spray -Kammer	double pass Scott-typ (-2°C)	Waschzeit	60 s
Sampling-Cone	Nickel, orifice 1,00 mm		
Skimmer-Cone	Nickel, orifice 0,75 mm	Standard 1	blank
Vakuum:Expansion	1,6 mbar	Standard 2	5 µg/l
Vakuum:Intermediate	1,0 x 10 ⁻⁴ mbar	Standard 3	10 µg/l
Vakuum: Analyzer	2,1 x 10 ⁻⁶ mbar	Standard 4	50 µg/l

Die Ergebnisse sind in Tabellen 5 und 6 samt Fig. 1-3 zusammengefaßt. Daraus ist deutlich ersichtlich, daß die Keimung der Samen in einer Elektrolytlösung zu einer deutlichen Erhöhung des Elektrolytgehaltes der Keimlinge führen, während die Keimung in destilliertem Wasser bzw. Leitungswasser bei vielen Ionenspezies eine Erniedrigung der Konzentration dieser Ionenspezies mit sich brachte.

Tabelle 5: Spurenelementkonzentrationen in Samen und Keimlingen
 von Weiz n, Buchweizen und Quinoa
 Angaben in mg/kg Trockengewicht

	WS0	WS1	WS2	WS3	WS4	WS5
Li	0,50	<0,01	<0,01	3,80	24,2	64,3
V	0,53	1,747	0,63	0,99	3,11	6,03
Cr	0,63	0,59	0,72	0,95	2,10	4,58
Fe	53,2	54,1	63,0	70,0	108	146
Mn	29,9	26,8	29,1	35,8	83,4	129
Co	0,06	0,01	<0,01	0,96	4,80	9,82
Ni	0,05	0,16	0,14	0,23	0,50	0,64
Cu	4,68	4,80	4,76	7,88	23,9	44,4
Zn	28,6	33,9	29,5	41,2	95,2	155
As	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	1,1	4,5
Se	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	1,7	5,4
Sr	1,93	1,50	1,21	8,60	50,2	107
Mo	1,08	1,00	1,01	1,28	3,10	6,26
Cd	0,04	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06
Pb	0,04	0,09	0,05	0,16	0,04	0,02

	BS0	BS1	BS2	BS3	BS4	BS5
Li	0,19	0,09	0,05	5,25	39,8	164
V	0,27	0,17	0,50	0,44	3,21	11,4
Cr	0,95	0,84	1,08	0,98	3,67	11,9
Fe	67,0	74,5	79,5	71,4	125	280
Mn	16,2	18,8	19,2	24,6	68,5	184
Co	0,07	0,09	0,09	0,76	5,56	18,2
Ni	3,14	4,18	3,56	3,25	3,58	3,99
Cu	7,29	9,18	8,60	9,73	26,2	71,3
Zn	25,8	38,6	32,6	38,2	98,7	247
As	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	3,0	9,6
Se	0,3	0,3	0,3	0,5	3,4	14,7
Sr	0,47	0,94	0,42	6,80	49,2	181
Mo	0,73	0,97	0,91	1,21	4,07	17,0
Cd	0,06	0,08	0,06	0,07	0,08	0,13
Pb	<0,01	0,05	0,08	0,03	0,03	0,06

Fortsetzung: Tabelle 5

	QS0	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5
Li	5,55	2,15	2,79	7,18	64,4	244
V	0,44	0,47	0,45	0,58	3,75	13,0
Cr	0,82	1,13	0,94	1,21	4,26	12,8
Fe	84,3	89,7	85,7	101	187	375
Mn	20,0	16,5	18,7	11,2	78,9	287
Co	0,05	0,06	0,05	0,97	7,30	26,2
Ni	0,12	0,10	0,08	0,09	0,52	1,52
Cu	5,88	7,68	7,31	11,9	42,4	123
Zn	27,1	37,3	31,6	42,0	138	419
As	<0,3	<0,3	<0,3	0,4	3,7	10,8
Se	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	4	18,5
Sr	3,16	4,46	4,11	14,0	55,7	252
Mo	0,52	0,49	0,46	0,70	3,34	15,7
Cd	0,07	0,06	0,08	0,05	0,09	0,15
Pb	0,03	0,12	0,10	0,10	0,08	0,07

Tabelle 6: Spurenelementkonzentrationen in Samen und Keimlingen
nach Waschen mit heißem Wasser
Angaben in mg/kg Trockengewicht

	WS5	WSSH	BS5	BSSH	QS5	QSSH
Li	64,3	56,6	164	139	244	138
V	6,03	5,27	11,4	167	13,0	10,2
Cr	4,58	4,44	11,9	11,3	12,8	10,4
Fe	146	171	280	259	375	332
Mn	129	134	184	154	287	244
Co	9,82	9,83	18,2	12,7	26,2	20,3
Ni	0,64	0,77	3,99	3,22	1,52	1,27
Cu	44,4	44,3	71,3	61,7	123	102
Zn	155	165	247	203	419	372
As	4,5	3,3	9,6	8,2	10,8	9,3
Se	5,4	5,0	14,7	12,2	18,5	14,1
Sr	107	106	181	155	252	221
Mo	6,26	5,90	17,0	20,0	15,7	9,40
Cd	0,06	0,07	0,13	0,12	0,15	0,13
Pb	0,02	0,02	0,06	0,10	0,07	0,05

Fortsetzung: Tabelle 6

	WS1H	WS2H	WS3H	WS4H	BS1H	BS2H	BS3H	BS4H
Li	0,18	0,06	2,64	18,50	0,57	0,28	5,16	35,20
V	1,52	0,78	1,15	2,62	0,04	0,00	0,32	3,73
Cr	0,84	0,72	0,82	1,84	0,89	0,78	0,94	3,65
Fe	74,0	56,7	42,0	90,5	74,9	52,8	60,1	115,8
Mn	27,9	28,1	31,3	75,6	18,6	18,4	24,4	64,2
Co	0,01	0,00	0,66	4,20	0,09	0,06	0,74	4,40
Ni	0,09	0,05	0,17	0,34	3,96	2,75	2,98	2,84
Cu	4,87	4,31	6,31	21,00	9,23	7,40	9,89	24,93
Zn	35,2	28,2	35,0	85,5	38,1	29,4	38,9	92,7
As	<0,3	<0,3	<0,3	0,8	<0,3	<0,3	<0,3	2,50
Se	<0,3	<0,3	<0,3	1,5	0,50	0,40	0,50	3,00
Sr	1,57	1,15	6,48	44,80	1,04	0,50	7,26	49,70
Mo	1,02	1,01	1,21	2,62	1,09	0,99	1,25	3,97
Cd	0,04	0,04	0,05	0,05	0,08	0,06	0,06	0,07
Pb	0,07	0,04	0,07	0,02	0,05	0,05	0,07	0,04

	QS1H	QS2H	QS3H	QS4H
Li	2,34	2,89	5,47	39,23
V	0,12	0,40	0,60	2,80
Cr	0,69	0,89	1,17	3,97
Fe	84,0	107,0	115,0	195,0
Mn	15,4	20,0	11,1	74,0
Co	0,05	0,05	0,89	6,59
Ni	0,47	0,67	0,59	0,76
Cu	6,97	7,43	12,00	44,45
Zn	35,2	33,2	41,1	137,0
As	<0,3	<0,3	<0,3	3,10
Se	<0,3	<0,3	<0,3	3,40
Sr	3,85	3,95	13,50	55,60
Mo	0,52	0,53	0,67	2,56
Cd	0,05	0,07	0,12	0,11
Pb	0,10	0,11	0,09	0,06

2. Bestimmung der Ascorbinsäurekonzentration während der Keimung von Quinoa

Für diese Untersuchung wurde Quinoa-Samen in destilliertem Wasser (QS1, QS1H), Leitungswasser (QS2, QS2H) und Elektrolytlösung 2 (QS4, QS4H) bzw. 3 (QS5, QS5H) zur Keimung gebracht.

2.1. Extraktion

Ca. 0,8 g Probe wurden exakt in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 5 ml Extraktionslösung (5 % meta-Phosphorsäure, 8 % Essigsäure und 0,005 M EDTA) versetzt. Anschließend wurde das Röhrchen fest verschlossen und 4 min intensiv geschüttelt. Nach der Extraktion wurde die Probenlösung 5 min mit 10000 U/min zentrifugiert.

EP 0 770 324 A2

Die klare überständige Lösung wurde vor der HPLC-Analyse durch ein 0,2 µm Cellulosenitratfilter filtriert.

2.2. HPLC-Analyse

Die Bestimmung der Vitamin C-Konzentration erfolgte mittels Ionenpaar-reversed-phase-HPLC und UV-Detektion bei 265 nm. Die chromatographischen Parameter sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Quantifiziert wurde mittels externer Eichkurve. Als Standardlösung wurde eine 1000 mg/l Stammlösung (100 mg Vitamin C (Merck p.a.) in 100 ml Extraktionslösung) verwendet. Die Standards für die Eichkurve (20, 50 und 100 mg/l) wurden durch entsprechende Verdünnungen mit der Extraktionslösung hergestellt.

Tabelle 7:

Chromatographische Parameter zur Bestimmung von Vitamin C.	
Säule:	Hamilton PRP1; 10 µm, 4x250 mm
mobile Phase:	0,2 M Na-Acetat; 5 mM Tetrahexylammoniumbromid (THAB), pH 4,80
Fließgeschwindigkeit:	1,5 ml/min (2000 psi)
Injektionsvolumen:	100 µl
Detektion:	UV 265 nm

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt. Daraus ergibt sich, daß sich die Vitamin C-Konzentration der Keimlinge in Elektrolyt-gekeimten Samen erhöhte.

Tabelle 8:

Vitamin C-Konzentrationen in Samen und Keimlingen von Quinoa	
Quinoa	c [mg/100 g]
QS0	n.g.
QS1	6,0
QS1H	3,5
QS2	7,4
QS2H	2,9
QS4	7,9
QS4H	3,2
QS5	6,7
QS5H	4,2
n.g. = gemessen	

3. Bestimmung der Thiaminkonzentration in Mungobohnen-, Bockshorn- und Rettichkeimlingen

3.1. Samen von Mungobohnen, Bockshornklee und Rettich wurden in Leitungswasser (MS2, BoS2, RS2) und in einer Elektrolytlösung 4 gemäß Tabelle 9 (MS6, BoS6, RS6) 10 bis 12 h eingeweicht. Nach dem Einweichen erfolgte die Keimung bei Raumtemperatur und normalen Tag-Nachtlichtverhältnissen in handelsüblichen Keimgeräten, bestehend aus durchsichtigen übereinander angeordneten Plastischalen mit Ablaufvorrichtung. Die Keimzeit betrug durchschnittlich 3 Tage; pro Tag wurden die Keimlinge 2-mal gründlich mit Leitungswasser gewaschen. Nach der Keimung wurden die Proben direkt in Plastiksäckchen abgefüllt und eingefroren.

Die Proben der mit Elektrolytlösung 4 behandelten Keimlinge wurden vor der Trocknung 3-mal mit Leitungswasser und anschließend 3-mal mit dreifach destilliertem Wasser gewaschen. Die in Leitungswasser gekeimten Keimlinge wurden direkt ohne zusätzliche Behandlung getrocknet. Die Trocknung erfolgte gemäß Punkt 1.2.

Tabelle 9: Spurenelement- und Mineralstoffkonzentrationen der für die Keimung zur Thiaminkonzentration verwendeten Elektrolyt-

lösung (Elektrolytlösung 4). (Beim Auflösen in Leitungswasser
Bildung eines Niederschlags)

Substanz	c [mg/l]	Element	c [mg/l]
Kaliumhydrogenphosphat	1605,6	K	720
Magnesiumphosphat 30% H ₂ O	708	Mg	100
Zinksulfat x7H ₂ O	22	Zn	5
Eisen-II-gluconat	44,7	Fe	5
Manganchlorid	29,5	Mn	10
Kupfergluconat	71,4	Cu	10
Natriumselenit	0,33	Se	0,10
Natriummolybdat	0,25	Mo	0,10
Chrom-III-chlorid	0,51	Cr	0,10
Strontiumlactat	16,85	Sr	5
Lithiumcarbonat	26,75	Li	5

3.2. Analysengang

Von allen Proben wurden jeweils 2 Bestimmungen durchgeführt.

Hydrolyse und enzymatische Spaltung

Vor der Hydrolyse wurden die getrockneten Proben in einer Analysenmühle (Retsch) homogenisiert. Anschließend wurden 0,50 g Probe exakt in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen (Pyrex) eingewogen. Zur Probe wurden 8,5 ml 9,1 M HCl zugegeben; die Röhrchen wurden fest verschlossen und im Wasserbad bei 100°C 30 min unter mehrmaligem Aufschütteln gehalten. Nach Abkühlen der Röhrchen wurden zu der stark sauren Lösung 0,5 ml einer 2,5 M Natriumacetatlösung zugegeben. Der pH-Wert wurde dadurch auf einen Wert von 4,5-4,6 eingestellt. Danach wurden 1 ml der Enzymsuspension (1 g Diastase, Merck 1.03604, in 10 ml H₂O + 1 Tropfen Antischaummittel) zugesetzt und die Probe über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt.

Oxidation des Thiamins zu Thiochrom

Nach der enzymatischen Spaltung wurde die Probenlösung 20 min mit 3000 U/min zentrifugiert. Von der überständigen Lösung wurde 1 ml in ein Polystyrolröhrchen pipettiert. Zu dieser Lösung wurden 0,5 ml Oxidationsmittel (1 ml einer 1 %igen K₃[Fe(CN)₆]-Lösung + 10 ml 15 % NaOH) zugegeben und gut durchgemischt (5 x Aufziehen mit 0,5 ml Transferpipette). Danach wurde die Oxidationsreaktion durch Neutralisation mit 0,2 ml 40 % Phosphorsäure (H₃PO₄ 80 % : H₂O 1:1 v/v) gestoppt.

HPLC-Analyse

Vor der chromatographischen Trennung wurden die oxidierten Probelösungen 10 min mit 10000 U/min zentrifugiert. Die klaren Lösungen wurden ohne weitere Behandlung für die Analyse verwendet. Die chromatographischen Parameter sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tabelle 10:

Chromatographische Parameter zur Bestimmung von Thiamin	
Säule:	Hamilton PRP1; 10 µm, 4 x 250 mm
mobile Phase:	H ₂ O : MeOH 60:40 v/v
Fließgeschwindigkeit:	1 ml/min (2500 psi)
Injektionsvolumen:	100 µl
Detektor:	Fluoreszenz 375/435

Herstellung der Standardlösung:

Als Stammlösung wurden ca. 100 mg Thiaminhydrochlorid (Fluka 95160) in einen 50 ml Maßkolben exakt eingewogen. Dieser wurde bis zur 50 ml-Marke aufgefüllt und gut geschüttelt. Für die Quantifizierung mittels HPLC wurde diese Lösung 1:10000 verdünnt und anschließend analog den Probenlösungen mit Kaliumhexacyanoferrat oxidiert. Für die Erstellung der Eichkurve wurde die oxidierte Lösung noch einmal 1:1 und 1:3 mit Wasser verdünnt.

3.3. Ergebnisse

In Fig. 4 sind die Chromatogramme einer Standardlösung (104 µg/l) und der Probe BoS6 (Bockshornkleekeimlinge) zu sehen. Der Peak nach 10 min entspricht dem Thiochrom (oxidierte und stark fluoreszierende Form des Thiamins). Die Thiaminkonzentrationen der einzelnen Proben sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11:

Thiaminkonzentrationen (bezogen auf Thiaminhydrochlorid) in Keimlingen und Samen; Konzentrationsangaben in mg/100 g.					
Mungobohne		Bockshornklee		Rettich	
Probe	Vit B ₁	Probe	Vit B ₁	Probe	Vit B ₁
MS0	0,03	BoS0	<0,02	RS0	n.d.
MS2	0,02	BoS2	0,05	RS2	<0,02
MS6	0,08	BoS6	0,21	RS6	0,02

Ein deutlicher Anstieg der Thiaminkonzentration war während der Keimung von Bockshornklee zu beobachten. Im Samen konnte praktisch kein (<0,02 mg/100 g) Vitamin B₁ nachgewiesen werden, während in den Keimlingen bis zu 0,21 mg/100 g Vitamin B₁ vorhanden waren. Ebenso nahm die Thiaminkonzentration in der Probe Mungobohne während der Keimung zu. Auffallend ist vor allem, daß die Keimlinge der Elektrolytlösung gegenüber den Keimlingen des Leitungswassers eine bedeutend höhere Zunahme aufweisen.

Die Rettichkeimlinge beinhalteten nur eine sehr geringe Menge an Thiamin. Ob die Thiaminkonzentration während der Keimung für RS2 abgenommen hat, konnte aufgrund der fehlenden Analyse des Samens nicht festgestellt werden. Eine Zunahme der Thiaminkonzentration in der Probe RS6 konnte aber deutlich nachgewiesen werden.

Patentansprüche

- Verfahren zur Herstellung Elektrolyt-angereicherter Keimlinge, dadurch gekennzeichnet, daß keimfähige Samen in eine Elektrolytlösung eingebracht werden und die Keimlinge in der Elektrolytlösung bei einer geeigneten Temperatur während einer Zeitdauer, die ausreicht, um in den Keimlingen eine Elektrolyt-Anreicherung zu erzielen, inkubiert werden.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Keimlinge ausgewählt sind aus Weizen-, Buchweizen-, Quinoa-, Mungobohnen-, Bockshornklee-, Rettich-, Alfalfa-, Mais-, Kürbis-, Roggen-, Gersten-, Reis-, Adzuki-Bohnen-, Erbsen-, Hirse-, Kichererbsen-, Kresse-, Leinsamen-, Linsen-, Senf-, Sesam-, Sojabohnen-, Sonnenblumen- und Amaranthkeimlingen.
- Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine Elektrolyt-Lösung enthaltend

EP 0 770 324 A2

- 1 mg/l oder mehr, vorzugsweise 10 mg/l oder mehr, insbesondere 50 mg oder mehr, Zink-, Eisen-, Kalium-, und/oder Magnesium-Ionen,
- 0,5 mg/l oder mehr, vorzugsweise 5 mg/l oder mehr, insbesondere 25 mg/l oder mehr, Kupfer-, Mangan-, Strontium- und/oder Lithium-Ionen,
- 0,1 mg/l oder mehr, vorzugsweise 1 mg/l oder mehr, insbesondere 5 mg/l oder mehr, Selen-, Molybdän-, Chrom-, Arsen-, Vanadium- und/oder Kobalt-Ionen

zur Anwendung kommt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubation bei einer Temperatur zwischen 10 und 50°C, vorzugsweise zwischen 20°C und 30°C, erfolgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, daß die Inkubation während einer Zeitdauer von etwa 12 bis 240 Stunden, vorzugsweise von etwa 60 bis 100 Stunden, durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die inkubierten Keimlinge gewaschen, getrocknet und gegebenenfalls für den Verkauf geeignet verarbeitet werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß eine Elektrolytlösung enthaltend zumindest 0,5 mg/l Kupfer-, 1 mg/l Zink-, 0,1 mg/l Kobalt- und vorzugsweise mindestens 0,1 mg/l Molybdän-, 0,5 mg/l Lithium-, 1 mg/l Selen und 1 mg/l Vanadium-Ionen verwendet wird.
8. Keimlinge, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7.
9. Keimlinge mit einem gegenüber der Keimung in Leitungswasser erhöhtem Gehalt an Elektrolyten.

Anreicherung von Spurenelementen während der Keimung von Weizen

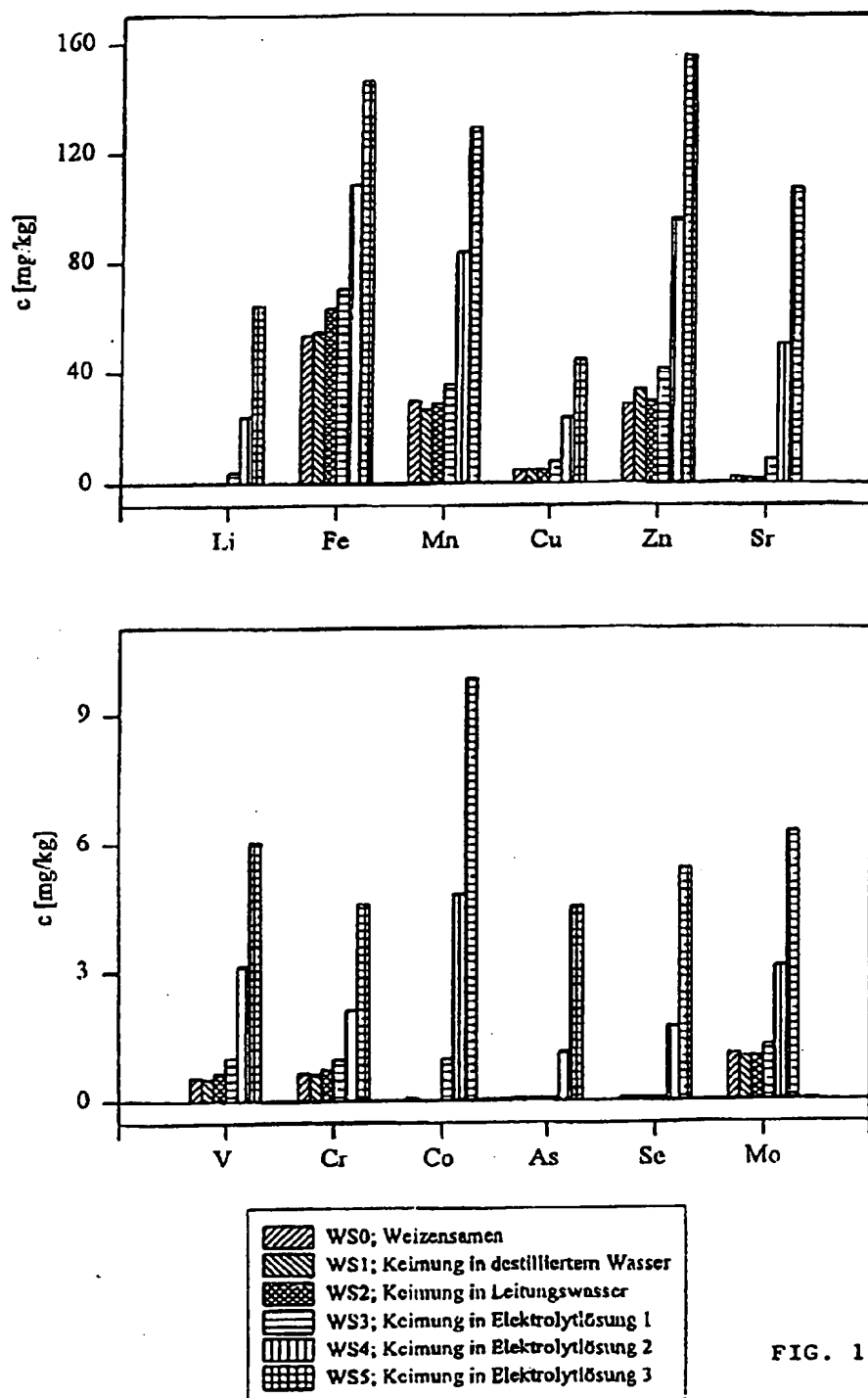


FIG. 1

Anreicherung von Spurenelementen während der Keimung von Buchweizen

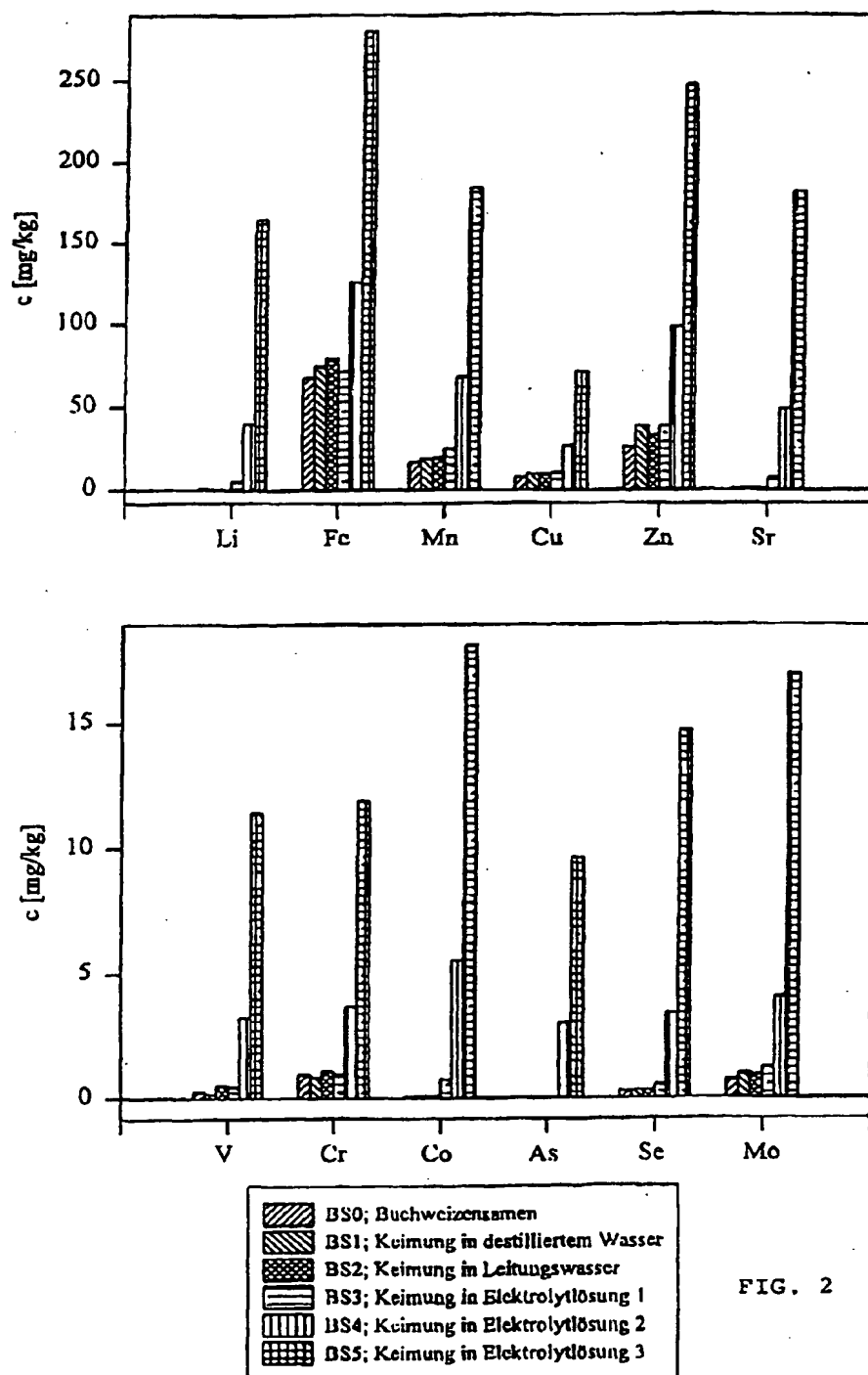


FIG. 2

Anreicherung von Spurenelementen während der Keimung von Quinoa

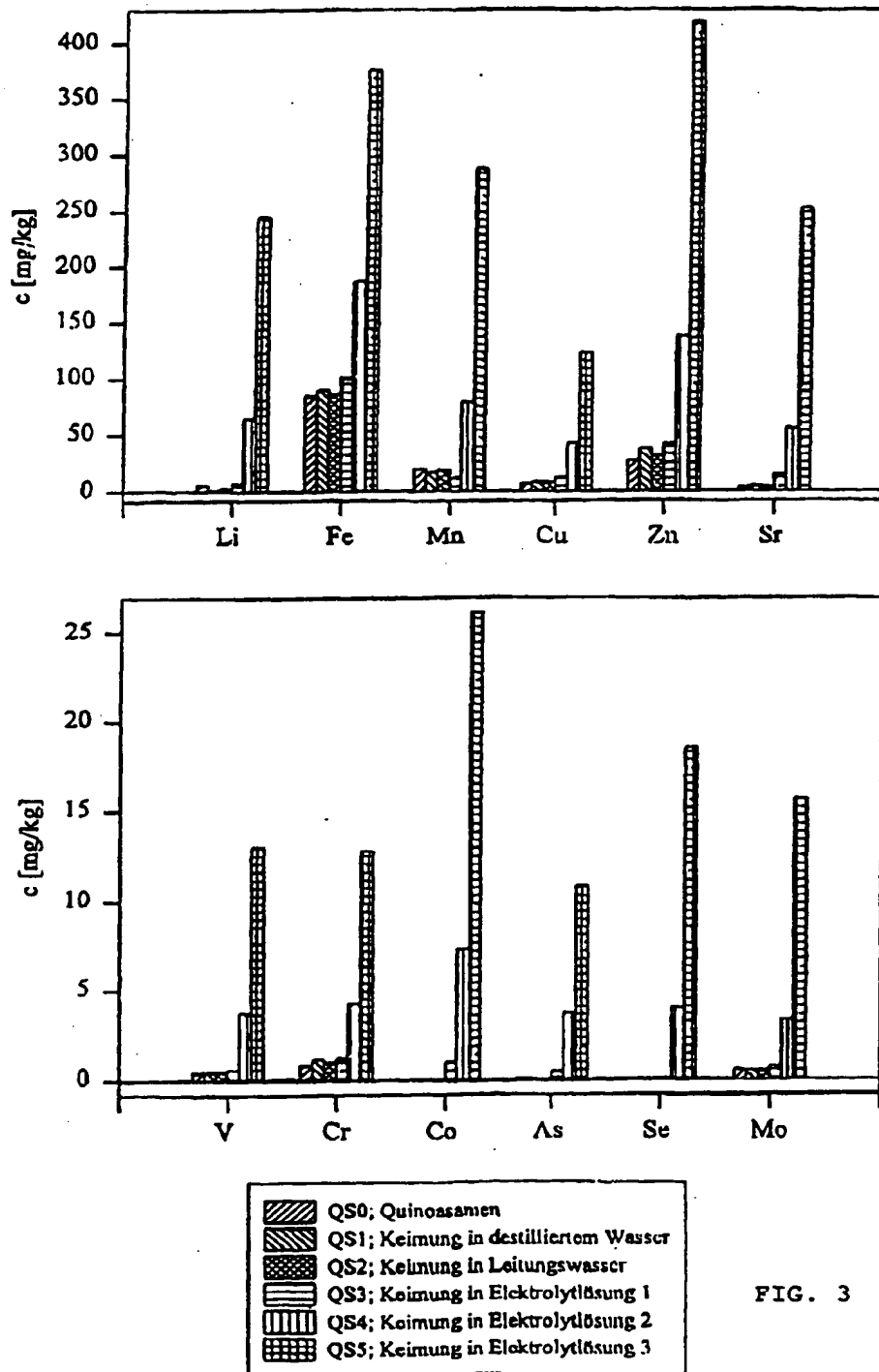
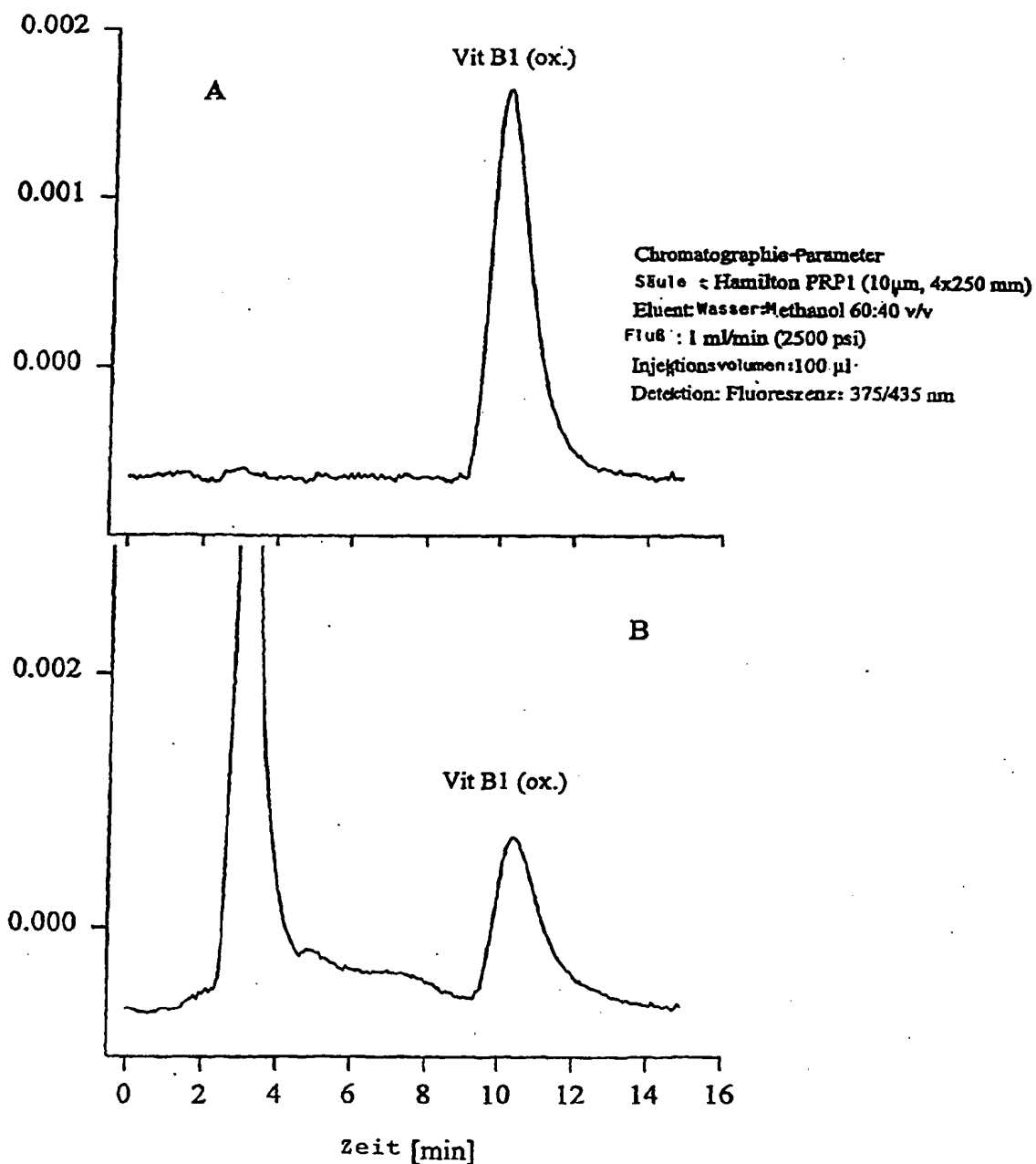


FIG. 3



Chromatogramme einer Standardlösung (104 µg/g Thiaminhydrochlorid) und der Probe B056
 (Bockshornkleekeimlinge nach 3 Tagen Keimzeit)

FIG. 4